MicroRNA 在昆虫变态及生殖过程中的调控作用

赵连丰#, 宋佳晟#, 周树堂*

(中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: MicroRNA(miRNA)是一类广泛存在于真核生物中的小分子非编码 RNA,通过抑制靶基因的翻译过程或降解靶基因的 mRNA,在转录后水平上调控基因表达。在昆虫中已报道了大量的 miRNA,其中部分 miRNA 的功能得到了解析。在昆虫变态过程中,let-7, miR-100, miR-125, miR-34, miR-14, miR-8, miR-281 和 miR-252-3p 能够作用于保幼激素或蜕皮激素信号通路,影响昆虫蜕皮、化蛹或翅、足及神经系统的发育。在昆虫生殖阶段,bantam, miR-184 和 miR-275 影响生殖干细胞的分化或卵子发生。本文在介绍 miRNA 生物合成和作用机制的基础上,重点对昆虫变态与生殖过程中 miRNA 的最新研究进展进行综述。

关键词: miRNA; 生物合成; 转录后调控; 昆虫变态; 昆虫生殖

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2015)01-0090-09

MicroRNAs in insect metamorphosis and reproduction

ZHAO Lian-Feng#, SONG Jia-Sheng#, ZHOU Shu-Tang* (State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNAs in animals, plants, fungi and viruses, regulate the gene expression at post-transcriptional level through translational repression or mRNA degradation. A large number of miRNAs have been reported in insects, but the number of miRNAs with documented functions is limited. During insect metamorphosis, let-7, miR-100, miR-125, miR-34, miR-14, miR-8, miR-281 and miR-252-3p have been demonstrated to function in juvenile hormone and/or ecdysone mediated signaling pathways and to modulate the development of wings, legs and neuronal system. In insect reproduction, bantam, miR-184 and miR-275 have been found to regulate the differentiation and maintenance of female germ line cells as well as the oogenesis. We summarized here the recent advances in the roles of miRNAs in insect metamorphosis and reproduction.

Key words: miRNA; biosynthesis; post-transcriptional regulation; insect metamorphosis; insect reproduction

Lee 等(1993)首次在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中发现小分子 RNA lin-4 能够使 *lin*-14 基因在翻译水平上受到抑制。到 2000 年,研究人员又在线虫中发现小分子 RNA let-7 能与 *lin*-41 基因的 mRNA 3′端非翻译区(untranslated region, UTR)结合,抑制 *lin*-41 基因的翻译(Reinhart *et al*., 2000)。随后的研究发现,这是一类长约 22 nt,能够使靶基因发生转录后沉默的小分子非编码 RNA,于是将其命名为 microRNA (miRNA)(Lagos-Quintana *et al*., 2001; Lau *et al*., 2001; Lee and Ambros, 2001)。siRNA (small interfering RNA)一般是外源引入的一类小分子 RNA,也具有沉默靶基因表达的功能(Fire *et al*., 1991; Guo and Kemphues, 1995)。利用 siRNA 的这种功能特性,研究人员开发了 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术,即通过引入人工合成的 siRNA 或 dsRNA(double-stranded RNA),在生物体内降解靶基因 mRNA,以研究靶基因的生物学功能

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372258)

作者简介: 赵连丰, 男, 1990 年生, 吉林洮南人, 硕士研究生, 细胞生物学专业, E-mail: zlf237@163.com; 宋佳晟, 男, 1985 年生, 博士研究生, 生物化学与分子生物学专业, E-mail: songjiasheng@ioz.ac.cn

#共同第一作者 Authors with equal contribution

*通讯作者 Corresponding author, E-mail: szhou@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2014-07-04; 接受日期 Accepted: 2014-11-21

(Kennerdell and Carthew, 1998)。RNAi 技术已经在细菌、植物、昆虫和哺乳动物中得到了广泛的应用。与 siRNA 不同,miRNA 是生物体内天然存在的小分子 RNA,在动物、植物和病毒等多物种间具有高度的保守性,对胚胎发育、组织分化、细胞增殖、细胞凋亡和形态发生等很多生物学过程都具有调节作用(Kloosterman and Plasterk, 2006)。近几年的研究表明,miRNA 在昆虫中广泛存在,也是调节昆虫变态与生殖的重要因子(Behura, 2007; Bellés *et al*., 2012; Lucas and Raikhel, 2013)。本文在对 miRNA 的生物合成和作用机制进行简要介绍的基础上,对 miRNA 调节昆虫变态与生殖的研究进展作一综述。

1　miRNA 的生物合成和作用机制

1.1　miRNA 的生物合成

与哺乳动物和植物类似,昆虫基因组中 miRNA 的编码区主要位于基因间或内含子中,也有部分 miRNA 的编码区存在于外显子中(Bartel, 2004; Kim, 2005)。研究人员利用秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 以及小鼠 *Mus musculus* 等模式生物对 miRNA 的生物合成机制开展了大量研究,发现 miRNA 在不同物种之间高度保守。在 RNA 聚合酶 II 的参与下,miRNA 首先被转录形成 miRNA 的初级转录产物 pri-miRNA。pri-miRNA 被核糖核酸酶 Drosha 和 Pasha 识别并剪切,形成发夹状的前体 miRNA(pre-miRNA)。pre-miRNA 被核转运受体 exportin-5 识别,与 exportin-5 及其辅因子 RanGTP 形成复合体后被转运到细胞质,随后被核糖核酸酶 Dicer 剪切形成 3′端带有 2 个游离核苷酸的 miRNA 双链复合体(Lee *et al*., 2003; Denli *et al*., 2004; Gregory *et al*., 2004; Kim, 2005),其中一条链 miRNA 与 Argonaute(Ago)一起构成 RNA 介导的沉默复合物(RISC)(Elbashir *et al*., 2001; Hammond *et al*., 2001; Du *et al*., 2005),而另一条链(miRNA*)被降解(Khvorova *et al*., 2003; Schwarz *et al*., 2003)。

1.2　miRNA 的作用方式

RISC 复合物在 miRNA 的指导下通过碱基互补配对与靶基因的 mRNA 结合,通过阻遏翻译或降解靶基因 mRNA,实现在转录后水平上抑制靶基因的表达(Bartel, 2004)。最初的研究认为,在绝大多数情况下,植物中 miRNA 能够降解其靶基因 mRNA (Jones-Rhoades *et al*., 2006),而在动物中 miRNA 通过抑制靶基因 mRNA 的翻译,实现转录后调控的功能。这种差异主要是由于 miRNA 识别靶基因的机制不同所造成的:植物中 miRNA 通过碱基的完全互补配对结合靶基因 mRNA,尤其是开放阅读框(open reading frame, ORF)上相应的区域;而在动物(包括昆虫)中,miRNA 5′端的第 2 - 8 个核苷酸为其种子区域(seed region),以碱基互补配对方式识别靶基因 mRNA 的 3′ UTR 区并与之结合(Wightman *et al*., 1993; Lai, 2002; Huntzinger and Izaurralde, 2011)。但近年来研究发现,植物中 miRNA 也可以抑制靶基因 mRNA 的翻译(Brodersen *et al*., 2008; Li *et al*., 2013),而在动物包括昆虫中也会出现靶基因 mRNA 被降解的情况(Behm-Ansmant *et al*., 2006; Giraldez *et al*., 2006; Wu *et al*., 2006; Eulalio *et al*., 2007)。对果蝇的进一步研究发现,miRNA 倾向于选择抑制靶基因的翻译作为其发挥转录后调控的首要方式(Djuranovic *et al*., 2012)。

随着研究的不断深入,人们发现动物包括昆虫中 miRNA 的靶位点也不局限于 3′UTR 区,miRNA 还可以与存在于 mRNA 5′UTR 或 CDS 区的靶位点结合,实现对靶基因的调控(Lytle *et al*., 2007; Bartel, 2009; Brodersen and Voinnet, 2009)。miRNA 与其靶基因的结合关系并非唯一:一个 miRNA 可以作用于一个或几个不同的靶基因 mRNA,而一个靶基因 mRNA 序列上也可以存在多个 miRNA 的靶位点(Brodersen and Voinnet, 2009; Shin *et al*., 2010)。miRNA 对 mRNA 调控方式的多样化,使得 miRNA 功能更丰富、更复杂,同时也为基因的调控方式和基因功能的研究带来了新的思路、开辟了新的领域。

2　miRNA 在昆虫变态中的作用

昆虫的变态主要由保幼激素(juvenile hormone, JH)和蜕皮激素(ecdysone 或 20-hydroxyecdysone, 20E)协同调控。蜕皮激素通过其核受体 EcR/USP 的异源二聚体及其早期反应基因如 *broad* 等诱导从幼虫到蛹的变态(Riddiford *et al*., 2003; Spindler *et al*., 2009)。保幼激素则通过其核受体异源二聚体 Met/SRC(又称 Taiman 或者 FISC)启动转录因子 *Kr-h1* 的表达,Kr-h1 抑制 *broad* 表达而发挥阻止变态或“维持原状”的作用(Konopova and Jindra, 2008; Minakuchi *et al*., 2009)。Kr-h1 也通过抑制 *E93* 的表达而阻止成虫特征的出现(Belles and Santos, 2014; Urena *et al*., 2014)。miRNA 作为一类重要的

调控生长发育的小分子 RNA，也参与到昆虫变态的激素调控通路，这在果蝇（Sempere *et al*., 2002; Bashirullah *et al*., 2003; Sempere *et al*., 2003）、家蚕 *Bombyx mori*（Jagadeeswaran *et al*., 2010）、烟草天蛾 *Manduca sexta*（Zhang *et al*., 2012）、德国小蠊 *Blattella germanica*（Gomez-Orte and Belles, 2009; Rubio *et al*., 2012）、飞蝗 *Locusta migratoria*（Wang *et al*., 2013）等多种昆虫中得到证实。

在果蝇中，*let-7-complex*（*let-7-C*）基因转录生成 miR-100，miR-125 和 let-7，这 3 个 miRNA 的表达受到 20E 和 broad 的调控（Sempere *et al*., 2002; Prochnik *et al*., 2007; Garbuzov and Tatar, 2010; Chawla and Sokol, 2012）。随后的研究发现，在果蝇幼虫后期和蛹期，let-7 和 miR-125 高表达，miR-34 则呈现相反的表达趋势，而此时 JH 滴度急剧下降，20E 滴度迅速增加以启动变态，那么这些 miRNA 的表达趋势是否和激素滴度的变化有关呢？对果蝇 S2 细胞进行激素处理后发现，20E 能够诱导 let-7，miR-100 和 miR-125 的表达，抑制 miR-34 的表达。JH 则具有与 20E 相反的作用，它抑制了 S2 细胞中 let-7，miR-100 和 miR-125 的表达，提高了 miR-34 的表达水平（Bashirullah *et al*., 2003; Sempere *et al*., 2003）。以上结果暗示，let-7，miR-100，miR-125 以及 miR-34 可能在 20E 和 JH 信号通路中发挥作用，影响果蝇的变态过程。在果蝇中过表达 let-7 和 miR-125 使幼虫的发育停滞在 1－2 龄期，最终导致死亡；果蝇 let-7 和 miR-125 的缺失使其在变态时翅碟细胞周期紊乱，细胞死亡率增加，造成翅发育缺陷；并且由于 let-7 的缺失，使其靶基因 *Abrupt* 过表达，导致成虫背腹部的神经肌肉接头（neuromuscular junctions）发育迟缓，不具备成虫的特征（Caygill and Johnston, 2008; Sokol *et al*., 2008）。20E 通过 EcR 不仅对上述 miRNA 具有调控作用，还对果蝇 miR-14 的表达具有抑制作用；另一方面 *EcR* 又是 miR-14 的功能性靶基因，受到 miR-14 的负调控；这样，20E 通过抑制 miR-14 的表达来减弱其对 EcR 的抑制作用，放大 20E 信号“强度”，继而发挥其调控变态的作用（Varghese and Cohen, 2007）。miR-8 是果蝇 Wnt/Wingless 的抑制因子，缺少 miR-8 的果蝇的化蛹率低并且神经系统发育存在缺陷；此外，miR-8 的缺失突变体表现为对高温敏感，腿部发育缺陷，化蛹成功率降低（Karres *et al*., 2007; Kennell *et al*., 2008, 2012）。

近年来，大规模 RNA 测序和生物信息学分析方法对发现和鉴定不同物种中的 miRNA 以及分析预测它们的功能起到了重要的推动作用。Jagadeeswaran 等（2010）通过构建家蚕不同发育阶段的 small RNA 文库，对其进行测序分析，鉴定得到 14 个家蚕特异的 miRNA（bmo-mir）和 101 个保守的 miRNA（conserved miRNA）。通过生物信息学预测发现，家蚕特异的 bmo-mir-2763 的靶基因是滞育激素受体 *DHR-4*，因该受体在家蚕的前胸腺中表达，作者推测 bmo-mir-2763 可能参与家蚕 20E 的合成（Watanabe *et al*., 2007; Jagadeeswaran *et al*., 2010）。JH 的合成和降解是控制昆虫血淋巴中 JH 浓度的两条重要途径（Sheng *et al*., 2008）。经过预测，保幼激素酸甲基转移酶（JH acid methyltransferase）基因是家蚕 bmo-mir-2998 的靶基因，而保幼激素酯酶（JH esterase）基因是 bmo-mir-2766 的靶基因，暗示家蚕变态发育过程中 JH 滴度可能受到这两个家蚕特异的 miRNA 调节（Jagadeeswaran *et al*., 2010）。同样在家蚕中，miR-281 参与 20E 信号通路，特异性地抑制 *EcR-B* 的表达，而 miR-281 的表达又受到 20E 的抑制，这样，在幼虫-蛹的变态阶段，由于 20E 的抑制，miR-281 的表达显著降低，使得 *EcR-B* 达到较高的表达水平，这对于促进幼虫-蛹的转变是很有必要的（Jiang *et al*., 2013）。家蚕中 miR-278 在化蛹期大量表达，而在果蝇中 miR-278 对能量的稳态起到重要的作用（Teleman *et al*., 2006），推测家蚕 miR-278 在变态时的能量代谢中发挥作用，进而影响家蚕的变态发育（Yu *et al*., 2008）。在转入 let-7 sponge 的转基因家蚕中，let-7 的下调表达引起家蚕的发育停滞在幼虫第 3 次蜕皮时和蛹期，表明 let-7 对于家蚕的蜕皮和变态具有重要的调控作用，并且 let-7 通过作用于 *FTZ-F1* 和 *E74* 发挥调控蜕皮的功能（Ling *et al*., 2014）。Gomez-Orte 和 Belles（2009）利用 RNAi 沉默德国小蠊末龄若虫 *dicer-1* 的表达，抑制了末龄若虫羽化成为成虫，这与阻断 JH 信号通路后的表型相似。相似的结果也在飞蝗中得到证实（Wang *et al*., 2013），说明 miRNA 在不完全变态昆虫的羽化中发挥着重要作用。进一步对德国小蠊羽化过程中的 miRNA 进行研究发现，let-7，miR-100 和 miR-125 在末龄若虫中大量表达，在倒数第 2 个若虫龄期中表达水平较低，这和此时蜕皮激素在体内滴度的变化是一致的。敲减 miR-100 导致成虫翅明显变小、翅脉畸形，敲减 let-7 也会造成翅脉畸形，这与干扰 *broad* 的表型相近。miR-252-3p 在倒数第 2 龄若虫

期高表达而在末龄若虫时表达水平显著降低，抑制 miR-252-3p 造成德国小蠊若虫生长和发育迟缓（Rubio *et al*., 2012; Rubio and Belles, 2013）。表 1 总结了经实验验证的、在昆虫变态中发挥调控作用的 miRNA。目前，参与调节昆虫变态的 miRNA 的研究主要以果蝇为模式，围绕 20E 信号通路，阐述激素、miRNA 和靶基因的相互作用与调控机制。在非模式昆虫中，多以 miRNA 的大规模测序为切入点，通过生物信息学分析，预测 miRNA 的功能和靶基因，进而对候选 miRNA 的功能做比较深入的研究。昆虫变态是一个复杂的生物学过程，对 miRNA 的进一步鉴定和功能分析，有助于系统地解析昆虫变态过程中 miRNA、基因与激素的调控网络和作用机制。

表 1　参与调节昆虫变态的 miRNA

Table 1　miRNAs involved in insect metamorphosis

miRNA	物种 Species	生物学功能 Biological roles	参考文献 References
let-7	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	JH 和 20E 信号通路 Juvenile hormone and ecdysone pathways; 翅发育 Wing development	Sempere *et al*., 2002, 2003; Bashirullah *et al*., 2003; Prochnik *et al*., 2007; Caygill and Johnston, 2008; Sokol *et al*., 2008; Garbuzov and Tatar, 2010; Chawla and Sokol, 2012
	德国小蠊 *Blattella germanica*	翅发育 Wing development	Rubio and Belles, 2013
	家蚕 *Bombyx mori*	蜕皮和变态 Molting and metamorphosis	Ling *et al*., 2014
miR-100	黑腹果蝇 *D. melanogaster*	JH 和 20E 信号通路 Juvenile hormone and ecdysone pathways	Sempere *et al*., 2002, 2003; Bashirullah *et al*., 2003; Prochnik *et al*., 2007; Garbuzov and Tatar, 2010; Chawla and Sokol, 2012
	德国小蠊 *B. germanica*	翅发育 Wing development	Rubio and Belles, 2013
miR-125	黑腹果蝇 *D. melanogaster*	JH 和 20E 信号通路 Juvenile hormone and ecdysone pathways; 翅发育 Wing development	Sempere *et al*., 2002, 2003; Bashirullah *et al*., 2003; Prochnik *et al*., 2007; Caygill and Johnston, 2008; Sokol *et al*., 2008; Garbuzov and Tatar, 2010; Chawla and Sokol, 2012
miR-34	黑腹果蝇 *D. melanogaster*	JH 和 20E 信号通路 Juvenile hormone and ecdysone pathways	Bashirullah *et al*., 2003; Sempere *et al*., 2003
miR-14	黑腹果蝇 *D. melanogaster*	20E 信号通路 Ecdysone pathway	Varghese and Cohen, 2007
miR-8	黑腹果蝇 *D. melanogaster*	化蛹 Pupation; 神经系统发育 Neuronal system development; 足发育 Leg development	Karres *et al*., 2007; Kennell *et al*., 2008, 2012
miR-281	家蚕 *B. mori*	20E 信号通路 Ecdysone pathway; 幼虫向蛹的转变 Larval-pupal transition	Jiang *et al*., 2013
miR-252-3p	德国小蠊 *B. germanica*	若虫生长发育 Nymphal development	Rubio *et al*., 2012

3　miRNA 在昆虫生殖过程中的作用

目前对 miRNA 调节昆虫生殖的报道还比较少，主要是通过 RNA 干扰 *dicer*1、*ago*1 等与 miRNA 生物合成及功能执行有关的基因，以及利用高通量测序鉴定与生殖相关的 miRNA，通过预测其靶基因分析 miRNA 的功能，构建 miRNA-mRNA 的相互作用网络。至目前，3 个 miRNA 在昆虫生殖过程中的功能得到了实验验证（表 2）。在果蝇中对 *dicer*1 进行缺失突变，阻断 miRNA 生物合成途径，能够显著抑制果蝇卵母细胞的成熟，说明 miRNA 在果蝇卵母细胞成熟过程中发挥着重要的调控作用（Nakahara *et al*., 2005）。*ago*1 在果蝇卵母细胞及卵泡细胞中高水平表达，*ago*1 缺陷型和缺失突变个体的卵小管仅含 8 个滋养细胞而没有卵母细胞，这与 *dicer*1，*pasha* 或 *drosha* 突变体的表型相似，表明 Ago1 以及依赖于 Ago1 的 miRNA 是果蝇卵母细胞形成所必需的（Azzam *et al*., 2012）。此外，Ago1 亦是雌性果蝇生殖干细胞（GSCs）维持所必需的，过表达 *ago*1 引起 GSCs 的过度增殖，而在 *ago*1 缺失突变体的卵巢中，GSCs 的自我更新被抑制，从而造成卵巢中 GSCs 细胞的缺失，表明 Ago1 及其参与的 miRNA 途径可以发挥内源调节作用维持 GSCs 的自我更新（Park *et*

al., 2007; Yang *et al.*, 2007)。果蝇中 dFmr1 蛋白能抑制卵巢中 GSCs 的分化从而维持其干细胞特性,bantam 能够与 dFmr1 蛋白相互作用抑制 GSCs 分化,对卵巢中 GSCs 的维持起着重要的作用(Yang *et al.*, 2009)。在果蝇 miR-184 缺失突变体的卵巢生殖区中,decapentaplagic (Dpp) 受体 Saxophone(Sax)蛋白增多,Dpp 信号被放大,造成 GSCs 的分化被抑制,同时这种抑制作用能因 *Sax* 的部分敲除而恢复,表明 miR-184 能够通过调控其靶基因 *Sax* 而调节 GSCs 的分化(Iovino *et al.*, 2009)。

近年来,对其他昆虫的研究也表明 miRNA 在昆虫生殖过程中发挥重要作用。对埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的研究发现,在脂肪体的体外培养基中同时添加 20E 和氨基酸能促进 miR-275 的表达,而单独使用 20E 或氨基酸并不能达到类似的效果。利用 miRNA 抑制剂干扰 miR-275,导致蚊子出现对血液的消化障碍,进而影响卵的成熟(Bryant *et al.*, 2010)。在家蚕中,对不同发育阶段的 RNA 样品进行大规模测序,鉴定出了 101 个物种间保守的 miRNA 和 14 个家蚕特异的 miRNA。利用生物信息学的方法对靶标基因进行预测,发现家蚕特异的 bmo-mir-2763 的一个靶基因 *GATAβ* 能够调节卵巢绒毛膜的发生,暗示 bmo-mir-276 可能在家蚕的卵巢发育过程中发挥作用(Jagadeeswaran *et al.*, 2010)。在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中干扰 *dicer*1,卵母细胞发育受到显著抑制(Zhang *et al.*, 2013)。利用 RNA-seq 的方法测定 JH 处理后飞蝗脂肪体中的 miRNA,鉴定出 83 个上调表达的 miRNA 和 60 个下调表达的 miRNA,对候选 miRNA 进行荧光定量 PCR 的验证证实了部分 miRNA 的表达受 JH 调控(Song *et al.*, 2013)。利用 RNAi 沉默 *ago*1 的表达,发现卵黄原蛋白基因(*vitellogenin*)的转录水平显著降低,同时卵泡上皮细胞发育、卵母细胞成熟和卵巢生长均受到严重的抑制,表明 Ago1 以及依赖于 Ago1 而发挥功能的 miRNA 对 JH 介导的飞蝗卵子发生是不可缺少的(Song *et al.*, 2013)。构建德国小蠊末龄若虫和成虫卵巢的小分子 RNA 文库,对其进行高通量测序,对比分析两种文库中 miRNA 组成的差异,发现在卵巢中富集了大量的德国小蠊特异的 miRNA,暗示这些 miRNA 可能在其卵巢的发育中发挥作用(Cristino *et al.*, 2011)。干扰德国小蠊的 *dicer*1 基因,阻断 miRNA 的生物合成途径,卵泡上皮细胞的发育以及卵母细胞的成熟均受到了显著的抑制(Tanaka and Piulachs, 2012)。利用高通量测序结合生物信息学分析在豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 中鉴定出了 149 个 miRNA,包括 55 个保守的 miRNA 和 94 个豌豆蚜特异的 miRNA。其中,17 个 miRNA 在不同生殖型中差异表达,有 7 个 miRNA 在性雌和性母中的表达水平显著不同,9 个 miRNA 在性雌和孤雌蚜中的表达水平有显著差异(Legeai *et al.*, 2010)。miR-34 在豌豆蚜的不同生殖型中差异表达,考虑到 miR-34 在果蝇中的表达同时受到 20E 和 JH 的调控(Sempere *et al.*, 2002., 2003)以及 JH 可能调控蚜虫生殖模式的转变(Corbitt and Hardie, 1985),推测 miR-34 可能在蚜虫生殖型转变中发挥作用。此外,保守的 miR-34 和 miR-307* 以及豌豆蚜特异的 miR-X47,miR-X103 和 miR-X52* 在性母和孤雌蚜中的表达存在差异,暗示这些 miRNA 可能在豌豆蚜从孤雌生殖到有性生殖的转变中发挥作用(Legeai *et al.*, 2010; Le Trionnaire *et al.*, 2013; Lucas and Raikhel, 2013)。与在昆虫变态中的 miRNA 研究类似,昆虫生殖阶段 miRNA 的功能研究依然以果蝇为主,在非模式昆虫中也以 miRNA 的大规模测序、生物信息学分析和靶基因预测为主,仅有 3 个 miRNA 在果蝇、埃及伊蚊生殖过程中的作用得以阐述。因此,昆虫生殖过程中 miRNA 的研究有待进一步加强,包括研究对象的拓宽、靶基因的鉴定、miRNA 的功能及调控机制。

表 2 参与调节昆虫生殖的 miRNA

Table 2 miRNAs involved in insect reproduction

miRNA	物种 Species	生物学功能 Biological roles	参考文献 References
bantam	黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*	GSCs 分化 GSCs differentiation	Yang *et al.*, 2009
miR-184	黑腹果蝇 *D. melanogaster*	雌性果蝇 GSCs 分化 GSCs differentiation of females	Iovino *et al.*, 2009
miR-275	埃及伊蚊 *Aedes aegypti*	卵的成熟 Oocyte maturation	Bryant *et al.*, 2010

4 小结与展望

昆虫 miRNA 的研究受到了越来越多的重视,在不同种类昆虫中发现了一系列的 miRNA。研究结果表明 miRNA 在昆虫发育、变态与生殖过程中起着重要的作用。但是,虽然 miRNA 数量众多,经实验研究,对昆虫变态与生殖起显著调控作用的 miRNA 报道的并不多。至目前为止,发现有 8 个 miRNA,包括 let-7, miR-100, miR-125, miR-34, miR-14, miR-8, miR-281 和 miR-252-3p,在昆虫变态中发挥重要作用;有 3 个 miRNA,包括 bantam, miR-184 和 miR-275,参与调节昆虫的生殖过程;研究对象集中于果蝇、家蚕、德国小蠊和埃及伊蚊。miRNA 在某种程度上与转录因子有所不同,影响昆虫变态与生殖的转录因子中,多数对其靶基因转录水平的调控力度都比较大,对表型的影响也比较大,这与 miRNA 和转录因子的作用机制不同密切相关,也与基因的转录调控和转录后调控需求不同有关。与转录因子相似,miRNA 的调控与功能具保守性,但在不同昆虫种类、不同组织或不同发育时期也有变化。一个 miRNA 在不同昆虫中可能具有不同的靶基因而执行不同的功能,多个 miRNA 可能调节单个靶基因,而单一 miRNA 也可能同时调节多个靶基因,反映了基因转录后水平调控的复杂性和多样性。近年来,昆虫变态的内分泌与基因调控,特别是 JH 和 20E 的协同调控取得了重要进展。对 miRNA 的进一步研究,有助于阐明昆虫激素-miRNA-基因的作用网络,揭示它们协同调控昆虫变态与生殖的分子机理。

目前,miRbase 数据库收录了来自不同物种的 28 645 条 miRNA (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014),与其他物种相比,昆虫 miRNA 的报道还比较少,已阐明功能的昆虫 miRNA 更少。另外,昆虫 miRNA 的研究目前主要集中于少数几个昆虫,如果蝇、家蚕、埃及伊蚊、德国小蠊、飞蝗、褐飞虱等,这可能与许多非模式昆虫缺乏基因组信息,遗传学手段受限,以及 miRNA 自身功能的特点、miRNA 功能研究的技术局限等有关。随着昆虫 miRNA 测序和昆虫基因组信息的不断丰富,更多的 miRNA 将会被鉴定,miRNA 在昆虫变态与生殖中的作用将被进一步揭示。近几年,研究人员已通过构建 miRNA 转基因动物来研究相关基因的功能,取得了一些重要的进展(Deng *et al*., 2011; Sandhu *et al*., 2013)。因而,在昆虫例如果蝇、家蚕或其他具有一定研究基础的昆虫中也可以尝试 miRNA 转基因技术,进而推进昆虫 miRNA 的研究,并作为潜在的手段用于益虫的利用或者害虫的防控。例如,针对昆虫变态、生殖过程中发挥关键调控作用的 miRNA,设计开发高效、低成本的拮抗剂或激动剂可作为害虫防控的潜在手段。

参考文献(References)

Azzam G, Smibert P, Lai EC, Liu JL, 2012. *Drosophila* Argonaute 1 and its miRNA biogenesis partners are required for oocyte formation and germline cell division. *Developmental Biology*, 365(2): 384–394.

Bartel DP, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281–297.

Bartel DP, 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215–233.

Bashirullah A, Pasquinelli AE, Kiger AA, Perrimon N, Ruvkun G, Thummel CS, 2003. Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Developmental Biology*, 259(1): 1–8.

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E, 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Developmental Biology*, 20(14): 1885–1898.

Behura SK, 2007. Insect microRNAs: structure, function and evolution. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 3–9.

Bellés X, Cristino AS, Tanaka ED, Rubio M, Piulachs MD, 2012. Insect microRNAs: from molecular mechanisms to biological roles. In: Gilbert L ed. Insect Molecular Biology and Biochemistry. Elsevier, Amsterdam. 30–56.

Belles X, Santos CG, 2014. The MEKRE93 (Methoprene tolerant-Kruppel homolog 1-E93) pathway in the regulation of insect metamorphosis, and the homology of the pupal stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 52: 60–68.

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O, 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880): 1185–1190.

Brodersen P, Voinnet O, 2009. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2): 141–148.

Bryant B, Macdonald W, Raikhel AS, 2010. MicroRNA miR-275 is indispensable for blood digestion and egg development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(52): 22391–22398.

Caygill EE, Johnston LA, 2008. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let*-7 and *miR*-125 heterochronic microRNAs. *Current Biology*, 18(13): 943–950.

Chawla G, Sokol NS, 2012. Hormonal activation of let-7-C microRNAs

via EcR is required for adult *Drosophila melanogaster* morphology and function. *Development*, 139(10): 1788 – 1797.

Corbitt TS, Hardie J, 1985. Juvenile hormone effects on polymorphism in the pea phid, *Acyrthosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 38(2): 131 – 135.

Cristino AS, Tanaka ED, Rubio M, Piulachs MD, Belles X, 2011. Deep sequencing of organ-and stage-specific microRNAs in the evolutionarily basal insect *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *PLoS ONE*, 6(4): e19350.

Deng Z, Chen JF, Wang DZ, 2011. Transgenic overexpression of miR-133a in skeletal muscle. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12 (1): 115.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ, 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014): 231 – 235.

Djuranovic S, Nahvi A, Green R, 2012. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, 336(6078): 237 – 240.

Du T, Zamore PD, 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 132(21): 4645 – 4652.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development*, 15(2): 188 – 200.

Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E, 2007. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes and Development*, 21(20): 2558 – 2570.

Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG, 1991. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, 113 (2): 503 – 514.

Garbuzov A, Tatar M, 2010. Hormonal regulation of *Drosophila* microRNA let-7 and miR-125 that target innate immunity. *Fly*, 4 (4): 306 – 311.

Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF, 2006. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312 (5770): 75 – 79.

Gomez-Orte E, Belles X, 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolan insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51): 21678 – 21682.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R, 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014): 235 – 240.

Guo S, Kemphues KJ, 1995. *Par*-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81(4): 611 – 620.

Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ, 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532): 1146 – 1150.

Huntzinger E, Izaurralde E, 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2): 99 – 110.

Iovino N, Pane A, Gaul U, 2009. *miR*-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Developmental Cell*, 17 (1): 123 – 133.

Jagadeeswaran G, Zheng Y, Sumathipala N, Jiang H, Arrese EL, Soulages JL, Zhang W, Sunkar R, 2010. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. *BMC Genomics*, 11(1): 52.

Jiang J, Ge X, Li Z, Wang Y, Song Q, Stanley DW, Tan A, Huang Y, 2013. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8): 692 – 700.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B, 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 19 – 53.

Karres JS, Hilgers V, Carrera I, Treisman J, Cohen SM, 2007. The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell*, 131(1): 136 – 145.

Kennell JA, Cadigan KM, Shakhmantsir I, Waldron EJ, 2012. The microRNA miR-8 is a positive regulator of pigmentation and eclosion in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 241(1): 161 – 168.

Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM, 2008. The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40): 15417 – 15422.

Kennerdell JR, Carthew RW, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled* 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7): 1017 – 1026.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD, 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2): 209 – 216.

Kim VN, 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5): 376 – 385.

Kloosterman WP, Plasterk RH, 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental Cell*, 11(4): 441 – 450.

Konopova B, Jindra M, 2008. Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolan metamorphosis. *Development*, 135(3): 559 – 568.

Kozomara A, Griffiths-Jones S, 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Reasearch*, 42: D68 – D73.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853 – 858.

Lai EC, 2002. Micro RNAs are complementary to 3′ UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature Genetics*, 30: 363 – 364.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP, 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543): 858 – 862.

Le Trionnaire G, Wucher V, Tagu D, 2013. Genome expression control

during the photoperiodic response of aphids. *Physiological Entomology*, 38(2): 117－125.

Lee RC, Ambros V, 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543): 862－864.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin*-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin*-14. *Cell*, 75(5): 843－854.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN, 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6959): 415－419.

Legeai F, Rizk G, Walsh T, Edwards O, Gordon K, Lavenier D, Leterme N, Mereau A, Nicolas J, Tagu D, Jaubert-Possamai S, 2010. Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *BMC Genomics*, 11(1): 281.

Li S, Liu L, Zhuang X, Yu Y, Liu X, Cui X, Ji L, Pan Z, Cao X, Mo B, Zhang F, Raikhel N, Jiang L, Chen X, 2013. MicroRNAs inhibit the translation of target mRNAs on the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Cell*, 153(3): 562－574.

Ling L, Ge X, Li ZQ, Zeng BS, Xu J, Aslam AFM, Song QS, Shang P, Huang YP, Tan AJ, 2014. MicroRNA Let-7 regulates molting and metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 53: 13－21.

Lucas K, Raikhel AS, 2013. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(1): 24－38.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA, 2007. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5′ UTR as in the 3′ UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23): 9667－9672.

Minakuchi C, Namiki T, Shinoda T, 2009. *Krüppel homolog* 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of *Methoprene-tolerant*, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Development Biology*, 325(2): 341－350.

Nakahara K, Kim K, Sciulli C, Dowd SR, Minden JS, Carthew RW, 2005. Targets of microRNA regulation in the *Drosophila* oocyte proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34): 12023－12028.

Park JK, Liu X, Strauss TJ, McKearin DM, Liu Q, 2007. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Current Biology*, 17(6): 533－538.

Prochnik SE, Rokhsar DS, Aboobaker AA, 2007. Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Development Genes and Evolution*, 217(1): 73－77.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G, 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901－906.

Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12): 1327－1338.

Rubio M, Belles X, 2013. Subtle roles of microRNAs let-7, miR-100 and miR-125 on wing morphogenesis in hemimetabolan metamorphosis. *Journal of Insect Physiology*, 59(11): 1089－1094.

Rubio M, De Horna A, Belles X, 2012. MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolan insect metamorphosis. *BMC Genomics*, 13(10): 386.

Sandhu SK, Fassan M, Volinia S, Lovat F, Balatti V, Pekarsky Y, Croce CM, 2013. B-cell malignancies in microRNA Eμ-miR-17～92 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45): 18208－18213.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD, 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2): 199－208.

Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V, 2002. The expression of the *let*-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 244(1): 170－179.

Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V, 2003. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-Complex gene activity. *Developmental Biology*, 259(1): 9－18.

Sheng Z, Ma L, Cao MX, Jiang RJ, Li S, 2008. Juvenile hormone acid methyl transferase is a key regulatory enzyme for juvenile hormone synthesis in the Eri silkworm, *Samia cynthica ricini*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69(3): 143－154.

Shin C, Nam JW, Farh KKH, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP, 2010. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular Cell*, 38(6): 789－802.

Sokol NS, Xu P, Jan YN, Ambros V, 2008. *Drosophila* let-7 microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes and Development*, 22(12): 1591－1596.

Song J, Guo W, Jiang F, Kang L, Zhou S, 2013. Argonaute 1 is indispensable for juvenile hormone mediated oogenesis in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(9): 879－887.

Spindler KD, Honl C, Tremmel CH, Braun S, Ruff H, Spindler-Barth M, 2009. Ecdysteroid hormone action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(24): 3837－3850.

Tanaka ED, Piulachs MD, 2012. Dicer-1 is a key enzyme in the regulation of oogenesis in panoistic ovaries. *Biology of the Cell*, 104(8): 452－461.

Teleman AA, Cohen SM, 2006. *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes and Development*, 20(4): 417－422.

Urena E, Manjon C, Franch-Marro X, Martin D, 2014. Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19): 7024－7029.

Varghese J, Cohen SM, 2007. MicroRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes and Development*, 21(18): 2277－2282.

Wang YL, Yang ML, Jiang F, Zhang JZ, Kang L, 2013. MicroRNA-

dependent development revealed by RNA interference-mediated gene silencing of *LmDicer*1 in the migratory locust. *Insect Science*, 20(1): 53 -60.

Watanabe K, Hull JJ, Niimi T, Imai K, Matsumoto S, Yaginuma T, Kataoka H, 2007. FXPRL-amide peptides induce ecdysteroidogenesis through a G-protein coupled receptor expressed in the prothoracic gland of *Bombyx mori*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 273(1): 51 -58.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G, 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin*-14 by *lin*-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5): 855 -862.

Wu L, Fan J, Belasco JG, 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(110): 4034 -4039.

Yang L, Chen D, Duan R, Xia L, Wang J, Qurashi A, Jin P, Chen D, 2007. Argonaute 1 regulates the fate of germline stem cells in *Drosophila*. *Development*, 134(23): 4265 -4272.

Yang Y, Xu S, Xia L, Wang J, Wen S, Jin P, Chen D, 2009. The bantam microRNA is associated with *Drosophila* fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. *PLoS Genetics*, 5(4): e1000444.

Yu X, Zhou Q, Li SC, Luo Q, Cai Y, Lin WC, Chen H, Yang Y, Hu S, Yu J, 2008. The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. *PLoS ONE*, 3(8): e2997.

Zhang X, Lu K, Zhou Q, 2013. Dicer1 is crucial for the oocyte maturation of telotrophic ovary in *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Geometroidea). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 84(4): 194 -208.

Zhang X, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Ren R, Sunkar R, Jiang H, 2012. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(6): 381 -395.

（责任编辑：赵利辉）